

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Sawo Manila

##### 2.1.1 Tinjauan Pustaka Sawo Manila

Tanaman sawo (*Manilkara zapota* (L.) van Royen) adalah anggota Sapotaceae yang banyak dibudidayakan di pekarangan dan banyak memiliki kegunaan. Getahnya digunakan untuk pembuatan permen karet. Daunnya dapat sebagai obat batuk, diare, demam, antibiotik dan antimikrobia (Chanda and Nagani, 2010), serta diketahui sangat baik untuk jantung dan pembuluh darah. Kayunya bermanfaat untuk bahan bangunan atau furniture (Salinas-Peba and Victor, 2007). Bunganya sebagai bahan kosmetik, buahnya digunakan sebagai makanan olahan dan manfaat utama dari tanaman ini ialah sebagai peneduh dan tanaman hias dalam pot (Thulaja, 1999).



**Gambar 2.1.1** Buah *Manilkara zapota* (Peiris, 2014)

##### 2.1.2 Klasifikasi Sawo Manila

Samini (2008) menyatakan bahwa kedudukan taksonomi tanaman sawo manila (*Manilkara zapota* L. Van Royen) adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Ebenales
Suku	: Sapotaceae

Marga : Manilkara  
 Jenis : *Manilkara zapota*

### 2.1.3 Nama Daerah

Sawo manila memiliki beberapa banyak nama seperti misalkan di negara Inggris, tanaman ini memiliki lebih dari 1 macam nama yaitu chickle gum, common naseberry, sapodilla, chicle tree, naseberry. Kemudian di negara Jerman, sawo manila juga memiliki banyak nama yaitu Breiapfelbaum, Sapodilla, Kaugummibaum (Peiris, 2014).

Adapun nama sawo manila untuk negara lain seperti sapoti di Brazil, Chico di Filipina, chiku di Hindia, ciku di Malaysia, sapota di Portugis, lamut di Thailand dan hông xiêm, xabôchê, tâm lu'c di Vietnam (Orwa *et al.*, 2009).

Di Indonesia sendiri, sawo manila dikenal dengan nama sawo londo, ciku dan sawo manila. Namun, suku jawa lebih sering menyebut sawo manila dengan sebutan sawo londo (Orwa *et al.*, 2009).

### 2.1.4 Morfologi Tanaman

Sawo manila (*Manilkara zapota*) adalah pohon buah yang dapat berbuah sepanjang tahun. Sawo manila memiliki pohon yang besar dan rindang, dapat tumbuh dengan ketinggian 30 - 40 m. Bunga dari tanaman ini merupakan bunga tunggal yang terletak pada ketiak daun dekat ujung ranting yang mana memiliki tangkainya kerap saring kali tergantung dengan panjang 1-2 cm. Diameter dari bunga sawo manila itu sendiri adalah bisa mencapai 1,5 cm. sisi luarnya berbulu dengan warna kulit yang kecoklatan. Kelopak biasanya tersusun dalam dua lingkaran dengan mahkota berbentuk genta berwarna putih dengan bentuk sampai setengah panjang tabung (Morton, 1987).

Daun sawo manila termasuk dalam kategori daun tunggal yang letaknya berselang-seling, sering mengumpul pada ujung ranting. Helai daun bertepi rata dengan warna hijau mengkilap yang sedikit berbulu dengan bentuk bundar-telur jorong sampai agak lanset, 1,5-7 x 3,5-15 cm, pangkal dan ujungnya bentuk baji, bertangkai 1-3,5 cm, tulang daun utama menonjol di sisi sebelah bawah. Bercabang rendah, batang sawo manila berkulit kasar abu-abu kehitaman sampai coklat tua. Seluruh bagiannya mengandung lateks, getah berwarna putih susu yang kental (Morton, 1987).

### 2.1.5 Ekologi dan penyebaran

Sawo manila adalah salah satu spesies tanaman yang dapat tumbuh pada daerah hutan hujan pada dataran rendah. Pohon tumbuh dengan baik dalam berbagai kondisi iklim dari daerah tropis basah, namun dapat juga tumbuh pada keadaan subtropis yang sejuk. Tapi tanaman akan lebih baik jika berada di daerah iklim panas yang lembab seperti yang ditemukan di dataran menengah sampai rendah di daerah tropis. Untuk proses pembuahan dari tanaman ini banyak atau tidaknya yang tumbuh sendiri tidak dipengaruhi oleh adanya hujan, namun faktor lain yang mempengaruhi adalah faktor suhu yang mana tanaman ini akan lebih maksimal buah yang dihasilkan jika ditanam pada suhu sekitar 42-43° C. Tanaman ini sering ditemukan pada daerah pesisir. Sawo manila dapat tumbuh pada daerah dengan curah hujan rata-rata sekitar 1250-2500 (Orwa *et al.*, 2009).

Sawo manila secara alami tumbuh pada negara Brasil, Kosta Rika, Kuba, El Salvador, Guatemala, Honduras, Meksiko, Nikaragua, Panama, Venezuela (Orwa *et al.*, 2009). Tanaman ini diperkirakan berasal dari daerah Guatemala, Meksiko dan Hindia Barat. Bangsa Spanyol sebagai penjajah membawa buah ini dari Meksiko ke Filipina, dan kemungkinan dari sana menyebar ke Asia Tenggara. Kini sawo manila telah ditanam di banyak daerah tropis di dunia (Morton, 1987).

### 2.1.6 Manfaat dan aktivitas biologi

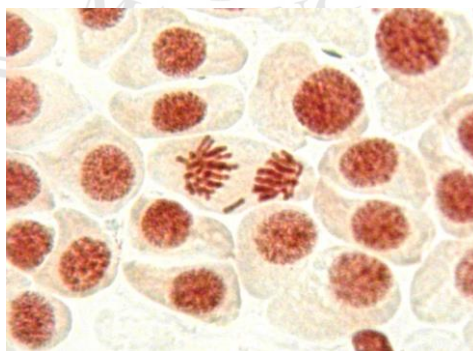
Sawo manila merupakan buah yang sangat populer di Asia Tenggara. Wilayah ini adalah produsen dan sekaligus konsumen utama buah ini di dunia (Astawan, 2008). Biji sawo manila digunakan secara tradisional sebagai aperients, tonik diuretic dan obat penurun panas, sementara pada kulit batang digunakan sebagai obat penurun panas. Selain itu, daun dan kulit kayu digunakan untuk mengobati batuk, disentri, diare dan untuk menghangatkan badan (Kirtikar, 2006). Penyelidikan fitokimia sebelumnya terungkap bahwa senyawa triterpenoid, saponin, polifenol, yang mana beberapa senyawa tersebut menunjukkan aktivitas  $\alpha$ -amilase kuat dan penghambatan  $\alpha$ -glukosidase, dan juga antimikroba, antioksidan dan aktivitas sitotoksik (Awasare *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012). Penggunaan obat tradisional yang meluas dan aktivitas biologis senyawa yang signifikan pada tanaman sawo manila masih dilakukan investigasi lebih lanjut.

Setelah dilakukan uji fitokimia, konstituen penting yang ada dalam biji sawo manila adalah saponin, sapotin, achrassaponin dan sapotinin (Zheng *et al.*, 2012). Senyawa yang diduga dapat bersifat sitotoksik adalah senyawa saponin pada biji sawo manila, yang mana identifikasi dan pengembangan saponin telah banyak berkontribusi pada pengobatan kanker dan banyak senyawa ini sekarang digunakan dalam praktik klinis. Hampir semua saponin menginduksi apoptosis pada sel tumor. Saponin lebih baik untuk pengobatan kanker, karena menghilangkan sel tumor dengan apoptosis sehingga dapat menurunkan efek samping pada pasien dengan menghindari nekrosis (Man *et al.*, 2010).

## 2.2 Tinjauan tentang Kanker

### 2.2.1 Definisi Kanker

Kanker adalah salah satu penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan dan penyebaran sel abnormal yang tidak terkontrol. Jika penyebarannya tidak terkontrol, maka dapat mengakibatkan kematian. Meskipun penyebab kanker terutama yang terjadi selama masa kanak-kanak, namun penyebab kanker sebenarnya tetap tidak diketahui. Penyebab kanker yang biasanya terjadi meliputi faktor gaya hidup (eksternal), seperti penggunaan tembakau dan kelebihan berat badan, dan faktor internal (mutasi) yang tidak dapat dimodifikasi, seperti mutasi genetik yang diwariskan, hormon dan kondisi kekebalan tubuh. Faktor risiko ini dapat bertindak secara simultan atau berurutan untuk memulai dan atau mendorong pertumbuhan kanker (American Cancer Society, 2017).



**Gambar 2.2.1** Sel Kanker (Urry *et al.*, 2017)

Kanker berasal dari serangkaian kejadian molekuler yang secara mendasar mengubah sifat normal sel. Pada sel kanker, sistem kontrol normal yang

mencegah pertumbuhan berlebih sel dan invasi jaringan lain akan dinonaktifkan. Sel-sel yang berubah ini membelah dan tumbuh dengan adanya sinyal yang biasanya menghambat pertumbuhan sel. Oleh karena itu, sel-sel kanker tidak lagi memerlukan sinyal khusus untuk menginduksi pertumbuhan dan pembelahan sel (Schneider, 2001).

### **2.2.2 Sifat dan Karakteristik Sel Kanker**

Seiring pertumbuhan, sel-sel kanker juga berkembang menjadi karakteristik baru, termasuk perubahan struktur sel, penurunan adhesi sel, dan produksi enzim baru. Perubahan yang diwariskan ini memungkinkan sel dan keturunannya untuk membelah dan tumbuh, bahkan di hadapan sel normal yang biasanya menghambat pertumbuhan sel di dekatnya. Perubahan tersebut memungkinkan sel kanker menyebar dan menyerang jaringan lain (Schneider, 2001).

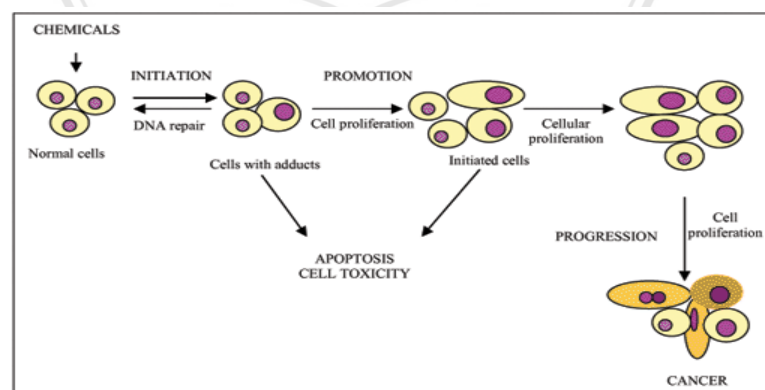
Model yang berlaku untuk melihat perkembangan suatu kanker adalah mutasi gen untuk supresor tumor dan onkogen yang menyebabkan kanker. Namun, beberapa ilmuwan menantang persepsi ini karena dianggap terlalu sederhana, dengan alasan bahwa beberapa peneliti gagal untuk menjelaskan keragaman genetik di antara sel-sel dalam tumor tunggal dan tidak cukup menjelaskan banyak penyimpangan kromosom khas sel kanker. Model alternatif menunjukkan bahwa ada "gen master" yang mengendalikan pembelahan sel. Mutasi gen master menyebabkan replikasi kromosom abnormal, menyebabkan keseluruhan bagian kromosom hilang atau diduplikasi. Hal ini menyebabkan perubahan dosis gen, sehingga sel menghasilkan terlalu sedikit atau terlalu banyak protein tertentu (Schneider, 2001).

Jika penyimpangan kromosom mempengaruhi jumlah satu atau lebih protein yang mengendalikan siklus sel, seperti faktor pertumbuhan atau supresor tumor, hasilnya mungkin adalah kanker. Ada juga bukti kuat bahwa penambahan kelompok metil yang berlebihan terhadap gen yang terlibat dalam siklus sel, perbaikan DNA, dan apoptosis adalah karakteristik beberapa jenis kanker. Mungkin ada beberapa mekanisme yang mengarah pada perkembangan kanker. Hal ini semakin mempersulit tugas sulit menentukan penyebab kanker (Schneider, 2001).

### 2.2.3 Proses Karsinogenesis

Karsinogenesis adalah suatu proses yang menghasilkan tranformaasi sel normal menjadi sel neoplastic yang disebabkan oleh perubahan genetic yang menetap atau mutasi (Muti,2010). Proses karsinogenesis secara bertahap diawali dengan proses inisiasi, dilanjutkan dengan promosi, dan berlanjut dengan progresi dari sel normal menjadi sel kanker (Dipiro, 2008)

Sel kanker berperilaku sebagai sel independen, tumbuh tanpa kontrol membentuk tumor. Tumor tumbuh dalam serangkaian langkah. Langkah pertama adalah hiperplasia, yang berarti bahwa ada terlalu banyak sel yang dihasilkan dari pembelahan sel yang tidak terkontrol. Sel-sel ini tampak normal, namun terjadi perubahan yang mengakibatkan kehilangan kendali pertumbuhan. Langkah kedua adalah displasia, akibat pertumbuhan lebih lanjut, disertai perubahan abnormal pada sel. Langkah ketiga membutuhkan perubahan tambahan, yang berakibat pada sel yang bahkan lebih abnormal dan bisa menyebar ke area yang lebih luas dari jaringan. Sel-sel ini mulai kehilangan fungsi aslinya, biasa disebut dengan anaplastik. Pada tahap ini, karena tumor masih terkandung di dalam lokasi asalnya (disebut *in situ*) dan tidak *invasive*, tidak dianggap ganas namun berpotensi menjadi ganas. Langkah terakhir terjadi ketika sel-sel di tumor bermetastasis, yang berarti mereka bisa menyerang jaringan sekitarnya, termasuk aliran darah, dan menyebar ke lokasi lain. Ini adalah jenis tumor yang paling serius, namun tidak semua tumor berkembang sampai saat ini (Schneider, 2001).



**Gambar 2.2.3** Proses Karsinogenesis (Oliviera *et al.*, 2007)

Jenis tumor yang terbentuk tergantung pada jenis sel yang awalnya diubah. Ada lima tipe tumor, yaitu sebagai berikut :

1. Karsinoma diakibatkan oleh sel epitel yang berubah, yang menutupi permukaan kulit dan organ dalam tubuh kita. Sebagian besar kanker adalah karsinoma.
2. Sarkoma diakibatkan oleh perubahan otot, tulang, lemak, atau jaringan ikat.
3. Leukemia diakibatkan oleh sel darah putih ganas.
4. Limfoma adalah kanker sel sistem limfatik yang berasal dari sumsum tulang.
5. Mieloma adalah kanker sel darah putih khusus yang membuat antibody (Schneider, 2001).

#### 2.2.4 Siklus Sel

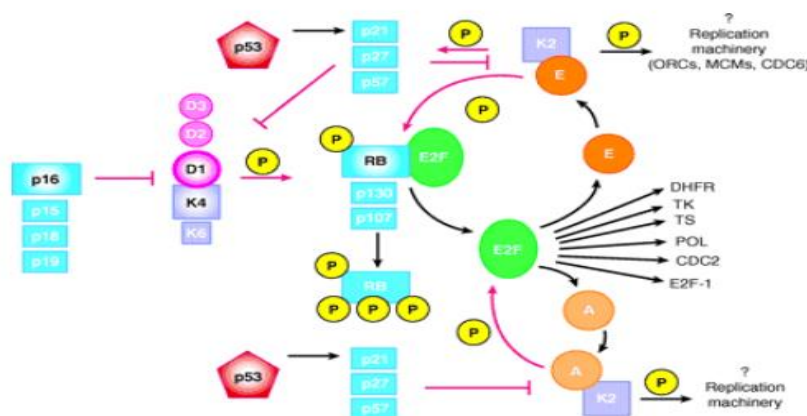
Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan setiap organisme. Secara normal, siklus sel menghasilkan pembelahan sel. Pembelahan sel terdiri dari 2 proses utama, yaitu replikasi DNA dan pembelahan kromosom yang telah digandakan ke 2 sel anak. Secara umum, pembelahan sel terbagi menjadi 2 tahap, yaitu mitosis (M) (pembelahan 1 sel menjadi 2 sel) dan interfase (proses di antara 2 mitosis). Interfase terdiri dari fase gap 1 (G1), sintesis DNA (S), gap 2 (G2). Setiap tahap dalam siklus sel dikontrol secara ketat oleh regulator siklus sel, yaitu:

- a. *Cyclin*. Jenis cyclin utama dalam siklus sel adalah *cyclin* D, E, A, dan B. Cyclin diekspresikan secara periodik sehingga konsentrasi cyclin berubah-ubah pada setiap fase siklus sel. Berbeda dengan *cyclin* yang lain, *cyclin* D tidak diekspresikan secara periodik akan tetapi selalu disintesis selama ada stimulasi growth factor.
- b. *Cyclin-Dependent Kinases* (CDK). Cdk utama dalam siklus sel adalah CDK 4, 6, 2, dan 1. CDKS merupakan treonin atau serin protein kinase yang harus berikatan dengan cyclin untuk aktivasinya. Konsentrasi Cdk relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdk dalam keadaan bebas (tak berikatan) adalah inaktif karena catalytic site, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. Cyclin akan menghilangkan pengebloka tersebut. Ketika diaktifkan, Cdk akan memacu proses downstream dengan cara memfosforilasi protein spesifik.



c. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor* (CKI), merupakan protein yang dapat menghambat aktivitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks cyclinCdk. Cyclin-dependent kinase inhibitor terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK4 (p15, p16, p18, dan p19) dan CIP/KIP (p21, p27, p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan Cdk sehingga mencegah Cdk mengikat cyclin D. INK4 bertugas mencegah progresi fase G1. Keluarga CIP/KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 cyclinCdk dan cyclin B-Cdk1. Protein p21 juga menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan proliferasi cell nuclear antigen (PCNA). Ekspresi p21 diregulasi oleh p53 karena p53 merupakan faktor transkripsi untuk ekspresi p21 (Vermeulen et al., 2003).

Siklus sel dimulai dari masuknya sel dari fase G0 (*quiescent*) ke fase G1 karena adanya stimulus oleh growth factor (Gambar 1). Pada awal fase G1, Cdk 4 dan 6 diaktifkan oleh cyclin D (cycD). Kompleks Cdk4/6 dengan cycD akan menginisiasi fosforilasi dari keluarga protein retinoblastoma (pRb) selama awal G1. Efek dari fosforilasi ini, fungsi histon deasetilasi (HDAC) yang seharusnya menjaga kekompakan struktur kromatin menjadi terganggu. Akibatnya struktur DNA menjadi longgar dan faktor transkripsi yang semula diikat pRb menjadi lepas dan transkripsi dari E2F responsive genes yang dibutuhkan dalam progresi siklus sel ke fase S menjadi aktif. Siklus Sel Gen tersebut antara lain cycE, cycA, Cdc25, DNA polimerase, timidilat kinase, timidilat sintetase, DHFR, dll (Satyanarayana and Kaldis, 2009; Vermeulen et al., 2003).

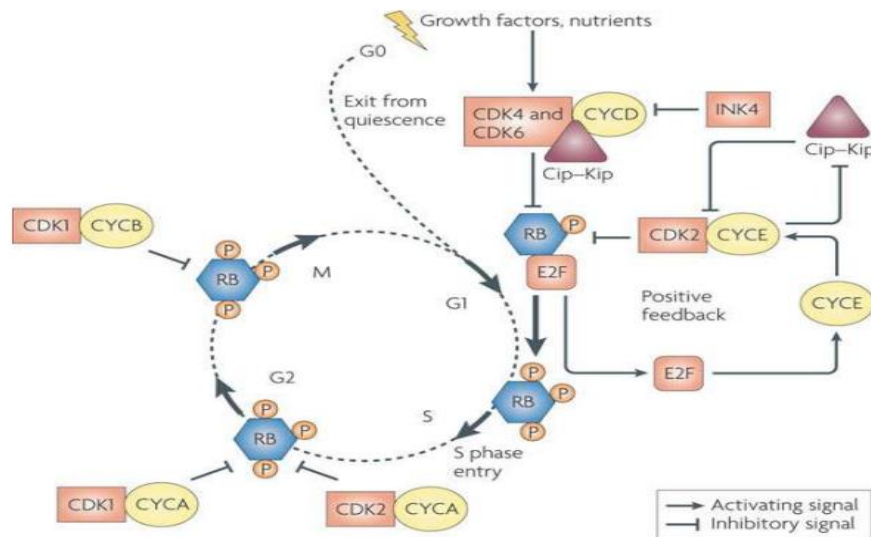


**Gambar 2.2.4.1** Siklus Sel (Sherr, 1996)



Pada transisi fase G1 ke fase S, Cdk2 aktif dengan mengikat cycE. Kompleks tersebut melanjutkan proses fosforilasi pRb (status hiperfosforilasi) supaya proses transkripsi yang dipacu E2F tetap aktif dan Restriction point (R) yang ada di batas fase G1/S dapat terlampaui. Pada saat inilah cycA ditranskripsi (Satyanarayana and Kaldis, 2009). Selama G1/S, kompleks Cdk2-cycE juga memfosforilasi inhibitor p27 sehingga p27 terdegradasi (Vermeulen et al., 2003). Ketika siklus sel akan memasuki fase S, cycE akan didegradasi dan Cdk2 yang dibebaskan akan mengikat cycA (Cooper and Hausman, 2004) (Gambar 2.2.4.2).

Kompleks Cdk2-cycA dibutuhkan sel untuk mereplikasi DNA selama fase S. Kompleks Cdk2-cycA akan memfosforilasi protein yang dibutuhkan dalam replikasi DNA supaya aktif, contohnya adalah protein CDC6 (Cell Division Cycle 6). Kompleks tersebut juga menjaga supaya tidak terjadi multiplicity replikasi DNA. Pada akhir fase S, cycA akan melepas Cdk2 dan mengikat Cdk1 (Cdc2) yang mengatur transisi sel dari S ke G2 (Dhulipala et al., 2006). Kompleks cycA-Cdk1 akan memfasilitasi kondensasi kromatin yang dibutuhkan untuk penggandaan sel (Lapenna and Giordano, 2009). Pada fase G2, sel juga memiliki kesempatan melakukan mekanisme repair apabila terjadi kesalahan sintesis DNA (Baumforth and Crocker, 2003).



**Gambar 2.2.4.2** Ilustrasi Umum Siklus Sel. Siklus sel terdiri dari 4 tahap, yaitu G1, S, G2, dan M. Progresi siklus sel dikontrol oleh cyclin (D, E, A, dan B), cyclindependent kinases (4, 6, 2, dan 1), dan cyclin-dependent kinase inhibitor (contohnya Cip dan Kip) (Lapenna and Giordano, 2009).

Memasuki fase mitosis, cycA akan didegradasi dan terjadi peningkatan ekspresi cycB yang akan mengikat Cdk1. Kompleks Cdk1-cycB secara aktif memacu mitosis. Kompleks cycB-Cdk1 berperan penting dalam control rearrangement mikrotubul selama mitosis (Dhulipala et al., 2006; Lapenna and Giordano, 2009).

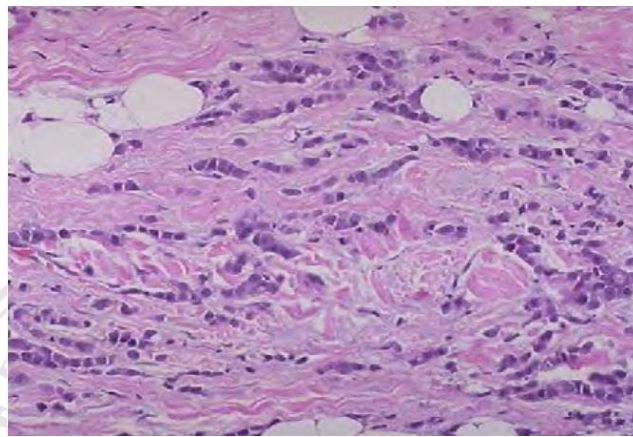
Cdk1 dapat dinonaktifkan oleh Wee1 dan Myt1 dengan cara Wee1 dan Myt1 akan memfosforilasi Cdk1 pada tirosin-15 dan atau threonin-14. Defosforilasi pada situs tersebut dapat dilakukan oleh Cdc25 sehingga Cdk 1 menjadi aktif kembali dan siklus sel tetap berlangsung (Vermeulen et al., 2003). Pada akhir fase mitosis, cycB akan didegradasi oleh anaphase promoting complex (APC) melalui proses proteolitik. APC juga berfungsi untuk memacu kromatid untuk berpisah bergerak ke masing-masing kutub untuk menyelesaikan mitosis (anafase) (Lapenna and Giordano, 2009).

### **2.3 Tinjauan tentang Kanker Payudara**

Kanker payudara adalah kanker paling umum kedua di dunia dan merupakan kanker yang paling sering diantara perempuan dengan perkiraan 1,67 juta kasus kanker baru yang didiagnosis pada tahun 2012 (25% dari semua kanker). Kanker payudara adalah tumor ganas yang terbentuk dari sel-sel payudara yang tumbuh dan berkembang tanpa terkendali sehingga dapat menyebar diantara jaringan atau organ di dekat payudara atau ke bagian tubuh lainnya (Kemenkes, 2016). Struktur anatomi payudara secara garis besar tersusun dari jaringan lemak, lobus dan lobulus yang memproduksi cairan susu, serta ductus lactiferous yang berhubungan dengan glandula lobus dan lobulus yang berfungsi mengalirkan cairan susu, di samping itu juga terdapat jaringan penghubung (konektif), pembuluh darah dan limphe node (American Cancer Society, 2013).

Sebagian besar kanker payudara bersifat invasif, atau infiltrasi. Kanker ini telah menembus dinding duktus atau kelenjar di mana mereka berasal dan tumbuh menjadi jaringan payudara di sekitarnya. Prognosis (perkiraan atau hasil) kanker payudara invasif sangat dipengaruhi oleh stadium penyakit - yaitu, tingkat atau penyebaran kanker saat pertama kali didiagnosis. Ada dua sistem pementasan utama untuk kanker. Klasifikasi tumor TNM menggunakan informasi mengenai

ukuran tumor dan seberapa jauh penyebarannya di dalam payudara (T), tingkat penyebaran ke kelenjar getah bening di dekatnya (N), dan ada tidaknya metastasis jauh (menyebar ke organ jauh) (M) .3 Begitu T, N, dan M ditentukan, tahap 0, I, II, III, atau IV diberikan, dengan tahap 0 berada di situ, stadium I merupakan tahap awal kanker invasif, dan tahap IV menjadi penyakit yang paling maju. Sistem pementasan TNM biasanya digunakan dalam setting klinis (*American Cancer Society*, 2013).



**Gambar 2.3** Sel Kanker Payudara (Leica, 2013)

Kanker payudara biasanya terdeteksi selama pemeriksaan skrining, sebelum gejala berkembang, atau setelah gejala berkembang, saat wanita merasakan adanya benjolan. Sebagian besar massa terlihat pada mammogram dan sebagian besar benjolan payudara berubah menjadi jinak yang berarti tidak bersifat kanker, tidak tumbuh tak terkendali atau menyebar, dan tidak mengancam jiwa. Bila kanker dicurigai berdasarkan pemeriksaan payudara klinis atau pencitraan payudara, analisis mikroskopik jaringan payudara diperlukan untuk diagnosis pasti dan untuk mengetahui tingkat penyebaran (in situ atau invasif) dan ciri pola penyakit. Jaringan untuk analisis mikroskopis dapat diperoleh melalui biopsi jarum atau bedah. Pemilihan jenis biopsi didasarkan pada faktor klinis pasien individual, ketersediaan perangkat biopsi, dan sumber daya tertentu (*American Cancer Society*, 2013).

#### **2.4 Tinjauan tentang pengobatan Kanker**

Terapi kanker payudara dapat digolongkan menjadi pembedahan, radioterapi, kemoterapi dan terapi hormonal (Jong, 2004). Salah satu terapi kanker

yang sering digunakan adalah kemoterapi. Kemoterapi adalah istilah untuk obat-obatan yang digunakan untuk menghentikan proses pertumbuhan sel tumor, baik itu menghambat pertumbuhan sampai dengan membunuh sel tumor. Namun ada beberapa alasan kenapa penggunaan kemoterapi tidak disarankan. Meski obat kemoterapi memiliki efek yang besar dalam mereproduksi sel tumor, obat kemoterapi tidak selalu bisa membedakan sel normal dan sel tumor yang harus dihambat atau dibunuh pertumbuhannya. Oleh sebab itu, karena mekanisme kemoterapi yang dapat bekerja pada sel normal, maka sel normal akan dihambat atau dibunuh pertumbuhannya sehingga dapat menyebabkan efek samping seperti luka mulut, diare, hingga kanker darah. Oleh karena itu, penggunaan obat kemoterapi pada pasien kanker harus dilakukan pemantauan sel darah secara terus menerus (*American Brain Tumor Association*, 2016).

Dari beberapa rekomendasi terapi kanker yang biasanya digunakan menimbulkan resiko yang lebih besar dibandingkan dengan manfaatnya, sehingga pengembangan obat-obat kanker yang berasal dari bahan alam sedang gencargencarnya dilakukan penelitian. Penelitian yang mengevaluasi potensi antikanker dari produk alami meningkat dengan cepat. Evaluasi praklinis melibatkan pengujian *in vitro* produk alami terhadap target molekuler spesifik yang terlibat dalam apoptosis, mitosis, kontrol siklus sel atau transduksi sinyal, evaluasi sitotoksitas atau mekanisme tindakan *in vitro* pada sel kanker dan sel normal lainnya, dan evaluasi dari aktivitas antitumour pada model hewan (Mishra et al., 2007). Evaluasi bioaktivitas juga harus menggabungkan metode untuk mengevaluasi potensi imunomodulasi, anti-invasi atau angiosupresif produk alami. Berbagai macam *bioassays* yang tersedia ini memerlukan sebuah keputusan strategis yang akan menjadi pengujian lini pertama, yang akan menentukan produk alami yang merupakan kandidat untuk evaluasi bioaktivitas berikutnya. Jelas bahwa evaluasi praklinis lengkap semua produk alami tidak mungkin dilakukan hanya karena biaya yang sangat tinggi tetapi juga pertimbangan etis. Penekanan yang berlebihan pada target molekuler dikritik sebagai simplistik dan reduksionis, dan studi tentang efek pada tingkat sel dinilai kembali (Houghton et al., 2007; Subramanian et al., 2006). Kasus penemuan vincristine dan vinblastine, obat antikanker yang disetujui pada awal 1960-an, yang menyebabkan

semisintesis vinorelin dan vindesine, menimbulkan implikasi menarik lainnya. *Catharanthus roseus* (dulunya *Vinca rosea*) digunakan dalam pengobatan ayurveda untuk pengobatan diabetes mellitus. Untuk mencari agen hipoglikemik yang efektif, Robert Noble dan Charles Beer terkejut saat mengetahui bahwa pemberian ekstrak *C. roseus* secara intravena pada tikus percobaan menghasilkan jumlah darah putih yang menurun dengan cepat, granulocytopenia, dan sumsum tulang yang tertekan (Duffin, 2002). Observasi kebetulan ini menyebabkan isolasi dan identifikasi vinblastine dan vincristine sebagai agen terapeutik yang poten dan senyawa timbal baru. Ada beberapa senyawa metabolit sekunder yang diduga memiliki aktivitas sitotoksik setelah dilakukan penelitian terlebih dahulu, yaitu :

Beberapa senyawa metabolit mempunyai aktivitas sebagai antikanker, yaitu sebagai berikut:

a. Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan bersifat basa, dan struktur kimianya mempunyai system lingkaran heterosiklik dengan nitrogen sebagai hetero atomnya (Sumardjo, 2008). Alkaloid memiliki aktivitas sebagai anti kanker / anti tumor yaitu menghambat pembelahan sel tumor dengan menghalangi mikrotubula depolimerisasi. Berdasarkan aktivitas antikanker atau antitumor, alkaloid sitotoksik terhadap berbagai jenis kanker dan leukemia, juga sebagai antivirus. Kebanyakan alkaloid dengan aktivitas antikanker antara lain indol, piridin, piperidin atau aminoalkaloids (Kintzios and Barberaki, 2004). Hal ini dibuktikan dengan penelitian uji sitotoksitas *isolate* sponge *Zyzya fuliginosa* terhadap kanker leukemia dengan harga IC<sub>50</sub>: 0,12 µg/ml, menunjukkan bahwa senyawa alkaloid berpotensi sebagai antikanker (Singla, 2014).

b. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang diketahui sebagai komponen penting diet manusia (Subroto & Saputro, 2007). Flavonoid adalah fenil pengganti chromones, yang turunan benzopyran, yang terdiri atas rangka dasar karbon-15(C6-C3-C6), kromon(C6-C3), inti (cincin benzo-A dan cincin heterosiklik C), juga berbagi oleh tokoferol, dengan fenil (cincin aromatik B) substitusi biasanya pada posisi-2. Substitusi yang berbeda biasanya dapat terjadi

pada cincin A dan B. Penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa flavonoid pada makanan tertentu memiliki aktivitas antitumor. Pola hidroksilasi pada cincin B flavon dan flavonol, seperti luteolin dan quercetin yang mempengaruhi inhibisi aktivitas protein kinase dan antiproliferasi. Flavonol dan flavon menargetkan sel permukaan enzim transduksi sinyal, seperti tirosin kinase protein dan adhesi focal kinase (FAK), dan proses angiogenesis menjadi sasaran yang menjanjikan sebagai obat antikanker (Kandaswami *et al*, 2005) (Soeksmanto *et al*, 2010).

Hasil penelitian oleh Dentofaisal (2014) menegaskan bahwa flavonoid fraksi etanol sarang semut menghambat proliferasi sel kanker lidah SP-C1 didukung secara teoritis, bahwa flavonoid dapat menghambat kinerja keseluruhan cyclin dependent kinase (Cdk) yang merupakan regulator siklus sel. Titik kerja flavonoid terletak pada hambatan kerja enzim Cdk-activating kinase (CAK) sehingga menghambat terbentuknya kompleks Cdk-cyclin yang aktif. Flavonoid dapat berikatan dengan protein kinase pada ATP-binding site-nya. Check point pada G1/S dan di G2/M terganggu oleh adanya flavonoid yang menghambat proses transduksi sinyal dari faktor pertumbuhan. Flavonoid mampu menginaktivasi protein-protein yang berperan dalam transduksi sinyal, misalnya tirosin kinase. Pernyataan-pernyataan tersebut menjelaskan kemungkinan terjadinya induksi *cell cycle arrest* oleh peran flavonoid.

#### c. Polifenol

Senyawa fenol dapat di definisikan secara kimiawi oleh adanya satu cincin aromatik yang membawa satu (fenol) atau lebih (polifenol) substitusi hidroksil, termasuk derivat fungsionalnya. Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yakni memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya. Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut yang dimiliki berbeda jumlah dan posisinya. Turunan polifenol sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Polifenol merupakan komponen yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan dalam buah dan sayuran (Hattenschwiler *and* Vitousek, 2000).

Polifenol diperkirakan mempengaruhi apoptosis yang menunjukkan sifat antikanker sehingga dapat dimanfaatkan. Mekanisme senyawa polifenol dengan melakukan inisiasi apoptosis yaitu melalui mengatur mobilisasi ion tembaga yang terikat untuk kromatin mendorong fragmentasi DNA. Resveratrol dipandang mampu mendegradasi DNA (Hadi *et al.*, 2006). Data diatas di dukung dengan penelitian uji sitotoksisitas madu dengan metode BSLT didapatkan harga  $IC_{50}$  yaitu 1,50  $\mu\text{g/ml}$ , sehingga polifenol berpotensi sebagai antikanker (Sumarlin *et al.*, 2014).

#### d. Terpenoid

Senyawa terpena dan terpenoid merupakan penggabungan antara unit-unit isoprene dan isopentan dan terbentuk di dalam tumbuhan sebagai hasil proses biosintesis (Robinson, 1995). Dalam biosintesisnya semua terpenoid berasal dari asam mevalonat. Berdasarkan aktivitas anti kanker/ anti tumor, terpenoid menjadi sitotoksik terhadap berbagai jenis kanker, seperti kanker prostat, kanker pankreas, kanker paru-paru dan leukemia. Terpenoid dari tanaman *Rabdosia trichocarpa* bersifat sitotoksik pada sel HeLa, serta tanaman *Maytenus* sp memiliki sifat sitotoksik pada leukemia (Kintzios and Barberaki, 2004).

Terpenoid telah terbukti menekan pertumbuhan sel kanker dengan bertindak pada perkembangan tumor, menghambat inisiasi dan promosi karsinogenesis, menginduksi diferensiasi sel tumor dan apoptosis dan menekan angiogenesis tumor, invasi dan metastasis melalui berbagai transkripsi (Bishayee *et al.*, 2011). Data tersebut di dukung dengan penelitian uji fraksi etil asetat golongan terpenoid ekstrak daun keladi tikus (*Typhonium divaricatum* L. Decne) terhadap sel kanker mulut rahim HeLa dengan metode *Bioassay* memiliki efek menghambat pertumbuhan sel kanker dengan Harga  $IC_{50}$  yang didapatkan yaitu sebesar 7,2  $\mu\text{g/mL}$  (Aryanti, 2004).

#### e. Antrakuinon

Antraknon merupakan senyawa turunan antrasena yang diperoleh dari reaksi oksidasi antrasena. Golongan ini memiliki aglikon yang sekerabat dengan antrasena yang memiliki gugus karbonil pada kedua atom C yang berseberangan (atom  $C_9$  dan  $C_{10}$ ), larut dalam air panas atau alkohol encer. Antraknon yang mengandung gugus karboksilat dapat diekstraksi dengan penambahan basa,



misalnya dengan natrium bikarbonat. Hasil reduksi antrakinon adalah antron dan antranol terdapat bebas di alam atau sebagai glikosida (Stanitsky, 2003).

Antrakuinon telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikanker. Dalam sebuah penelitian diketahui bahwa kandungan dari buah mengkudu adalah antrakuinon, yaitu damnakantal yang secara *in vitro* dapat mengacaukan gen sel kanker saat melakukan proliferasi. Salah satu komponen yang terdapat pada buah mengkudu juga dapat mematikan sinyal dari sel tumor untuk berproliferasi (Witantri *et al.*, 2015). Data tersebut didukung dengan penelitian uji sitotoksitas ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT *assay* memiliki daya hambat pertumbuhan sel kanker dengan IC<sub>50</sub> sebesar 1,17 µg/mL (Febriansah *et al.*, 2012).

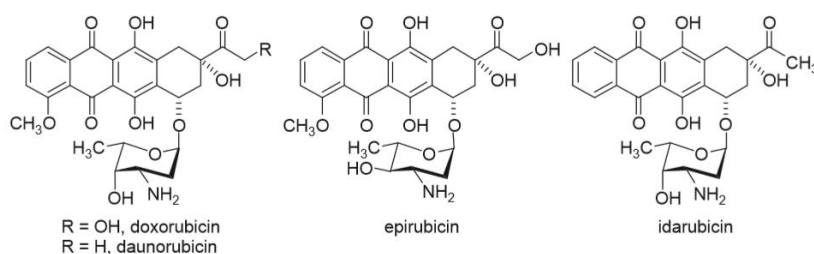
#### f. Saponin

Saponin merupakan senyawa golongan kimia yang memiliki bobot molekul dan polaritas tinggi. Saponin sering terbentuk sebagai campuran kompleks satu dengan yang lainnya. Adanya busa pada saat mengekstraksi tumbuhan menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut mengandung saponin (Harbone, 1987). Saponin diduga memiliki aktivitas antikanker (Boik, 2001). Senyawa-senyawa saponin telah diketahui dapat menghambat pembentukan Bcl-2 yang diekspresikan terlalu tinggi, menginduksi protein caspase-3 yang diekspresikan terlalu rendah, meningkatkan ekspresi p53, dan dapat pula memicu G1 cell cycle arrest (Raju *et al.*, 2004). Dari data tersebut didukung dengan penelitian uji sitotoksitas isolasi senyawa saponin dari Persia Gulf Ophiuroidea (*O. Phiocoma erinaceus*) terhadap sel kanker serviks (sel HeLa) dengan metode MTT yaitu memiliki efek sitotoksik dengan harga IC<sub>50</sub> sebesar 12,5 µg/mL dalam 48 jam dan 25 µg/mL dalam 24 jam (Armini, 2014).

## 2.5 Tinjauan Tentang Doxorubicin

Pilihan pengobatan yang bisa dipertimbangkan adalah operasi, radioterapi, kemoterapi sitotoksik dan manipulasi hormonal atau terapi endokrin. Pilihan pengobatan untuk kanker payudara pada awalnya diidentifikasi sesuai dengan stadium penyakit. Pengobatan untuk stadium lanjut kanker payudara mungkin melibatkan operasi yang lebih agresif (mastektomi total atau radikal) dalam kombinasi dengan kemoterapi dan radioterapi adjuvan. Regimen berbasis

Anthracyclin (doxorubicin atau epirubicin) atau taxane (paclitaxel atau docetaxel) digunakan dalam pengaturan neo-adjuvant (pra operasi) untuk kanker payudara invasif lokal. Pada penyakit rekuren atau metastasis (tahap IV) yang lebih lanjut, status menstruasi serta adanya reseptor estrogen (ER) merupakan faktor penentu penting terapi farmakologis. Tamoxifen, letrozole, anastrozole dan exemestane adalah obat kunci yang digunakan dalam pengaturan adjuvant pasien ER-positif pada kelas ini, sementara pasien adjuvan ER-negatif diobati dengan trastuzumab dan beberapa koktail chemotherapeutic yang terdiri dari doksorubisin, epirubicin, doksorubisin liposomal, doketaxel, capecitabine, vinorelbine, gemcitabine dan albumin-bound paclitaxel (Missailidis, 2008).



**Gambar 2.5** Struktur Kimia *Doxorubicin* (Arcamone, 2005)

*Doxorubicin* diisolasi di Italia pada tahun 1960an dari budaya *Streptomyces peucetius*, menunjukkan spektrum aktivitas antitumour yang luas, terutama terhadap tumor padat. Persiapan skala besarnya melibatkan proses semisintetik mulai dari daunorubisin yang dikembangkan pada awal 1970-an (Arcamone, 2005).

*Doxorubicin* digunakan secara luas untuk pengobatan spektrum tumor yang luas, terutama untuk tumor padat. Obat ini sering diindikasikan untuk kanker payudara, kanker ovarium, kanker kandung kemih sel peralihan, kanker paru-paru bronkogenik, kanker tiroid, kanker lambung, jaringan lunak dan sarkoma osteogenik, neuroblastoma, tumor Wilms, limfoma ganas (Hodgkin's dan non-Hodgkin's), leukemia myeloblastic akut, leukemia limfoblastik akut, dan sarkoma Kaposi. Keterbatasan utama penggunaan klinis doksorubisin adalah pengembangan resistensi sel tumor dan kardiotoxicitas. Kardiomiopati dilatasi dan gagal jantung kongestif adalah efek samping kumulatif yang biasanya muncul

setelah 1 tahun. Untuk mencegah efek parah ini, dosis kumulatif maksimum 600 mg / m<sup>2</sup> telah ditetapkan. Efek samping yang paling tidak biasa adalah mual, muntah, kehilangan nafsu makan, diare, dan kerusakan rambut dan kulit (Minotti *et al.*, 2004).

*Doxorubicin* secara umum telah dipertimbangkan untuk memberikan efek biologisnya dengan bekerja sebagai inhibitor topoisomerase II $\alpha$  (Gewirtz, 1999). Kondisi ini dapat menghambat kerja topoisomerase II yang berfungsi menguraikan plin DNA untuk persiapan transkripsi. *Doxorubicin* membuat kompleks topoisomerase II tetap stabil meski telah mengudarkan pilinan ganda DNA (Tjay dan Raharja, 2007).

*Doxorubicin* harus diadminstrasi melalui intravena Karena obat ini menjadi tidak aktif jika diserap melalui saluran cerna. *Doxorubicin* tanpa ionisasi dapat menembus masuk sel melalui difusi. Difusi *doxorubicin* lebih lambat berbanding daunorubicin karena doxorubicin adalah lebih polar berbanding daunorubicin. Selain itu, pH intraseluler dan ekstraseluler dapat mempengaruhi dari uptake anthracycline dan sitotoksik sel karena obat menjadi protonasi apabila ada perubahan pH. Kemudian, *doxorubicin* akan mengalami metabolisme dihati dan metabolit primernya yang aktif adalah doxorubicinol. Setelah itu, ekskresi *doxorubicin* adalah sekitar 90% melalui feses dan sekitar 10 % melalui urin (Speth *et al.*, 1988). Penggunaan *doxorubicin* secara klinis menjadi terbatas. Hal ini disebabkan oleh efek samping pada pemakaian kronisnya yang bersifat ireversibel, termasuk terbentuknya cardiomyopathy yang dapat menyebabkan gagal jantung (Han *et al.*, 2008).

## 2.6 Tinjauan tentang kultur sel

Kultur sel adalah salah satu alat utama yang digunakan dalam biologi seluler dan molekuler, menyediakan sistem model yang sangat baik untuk mempelajari fisiologi normal dan biokimia sel (misalnya studi metabolik, penuaan), efek obat dan senyawa toksik pada sel, proses mutagenesis dan karsinogenesis. Kultur sel juga digunakan dalam skrining dan pengembangan obat dan pembuatan senyawa biologis skala besar misalnya vaksin, protein terapeutik, dan lain-lain (Thermo Fisher Scientific, 2014).

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi jaringan hidup. Jaringan yang digunakan dipecah-pecah terlebih dahulu melalui proses enzimatis, kimiawi maupun secara mekanis untuk menghasilkan suspensi sel yang kemudian ditanam di dalam media yang sesuai. Kultur ini disebut dengan kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang ataupun hasil transformasi dari kultur *cell line*. Pemisahan kultur *cell line* berdasarkan karakteristik tertentu akan menghasilkan kelompok-kelompok tertentu yang disebut dengan *strain cell*. Keuntungan dari kultur tersebut dilihat dari segi kontrol lingkungan fisika kimia yang lebih tepat dan kondisi biologis yang relatif konstan. Karakteristik dan homogenitas sampel dari sistem kultur sel jauh lebih baik dibandingkan jaringan dari hewan. Dari segi ekonomis lebih menguntungkan, karena pereaksi yang digunakan lebih sedikit (Freshney, 1987).

## 2.7 Tinjauan Tentang Sel T47D

Sel T47D merupakan continuous cell line yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO<sub>2</sub> inkubator 5% dan suhu 37°C (Abcam, 2007).

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Missense mutation* terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi *cell cycle*. Sel T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif (Schafer *et al.*, 2000). Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya (Verma *et al.*, 1998). Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri *et al.*, 2002).

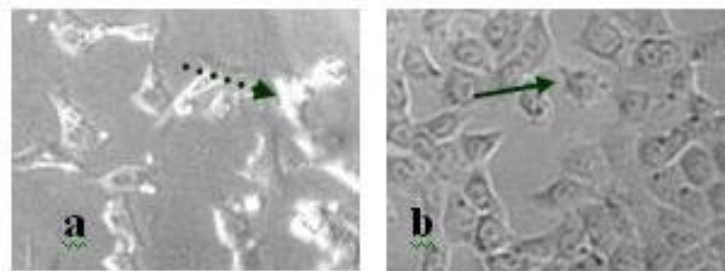
## 2.8 Perbedaan Sel T47D & Sel MCF-7

Salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian adalah sel MCF7 dan sel T47D. Sel MCF-7 adalah sel kanker payudara

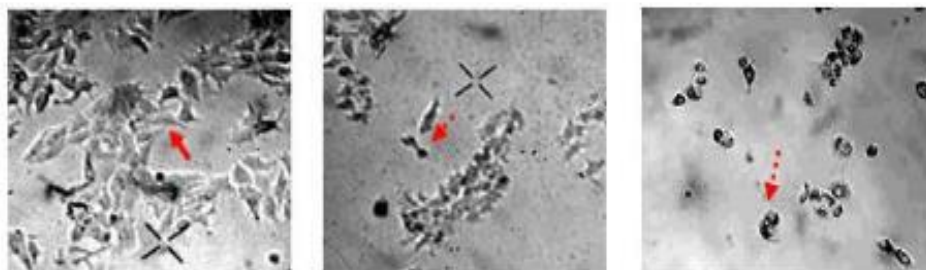
yang diperoleh dari *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang pasien wanita Kaukasian berumur 69 tahun, golongan darah O, dengan Rh positif. Sel menunjukkan adanya diferensiasi pada jaringan epitel mammae termasuk diferensiasi pada sintesis estradiol. Media dasar penumbuh sel MCF-7 adalah media EMEM terformulasi. Untuk memperoleh media kompleks, maka ditambahkan 0,01 mg/ml bovine insulin dan FBS hingga konsentrasi akhir FBS dalam media menjadi 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%. Sel MCF-7 tergolong *cell line adherent* (ATCC, 2008b) yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- $\alpha$ ), resisten terhadap *doxorubicin* (Zampieri *et al.*, 2002), dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki *et al.*, 2003; Prunet *et al.*, 2005). Karakteristik tersebut membedakannya dengan sel kanker payudara lain, seperti sel T47D.

Sel kanker payudara T47D merupakan *continous cell lines* yang morfologinya seperti sel epitel yang diambil dari jaringan payudara seorang wanita berumur 54 tahun yang terkena ductal carcinoma. Sel ini dapat ditumbuhkan dengan media dasar penumbuh RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640. Untuk memperoleh media kompleks, maka ditambahkan 0,2 U/mL bovine insulin dan Foetal Bovine Serum (FBS) hingga konsentrasi akhir FBS dalam media menjadi 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%. Sel ini termasuk *cell line adherent* (ATCC, 2008) yang mengekspresikan ER- $\beta$  (Zampieri *et al.*, 2002) dibuktikan dengan adanya respon peningkatan proliferasi sebagai akibat pemaparan 17 $\beta$ -estradiol (Verma *et al.*, 1998). Sel ini memiliki *doubling time* 32 jam dan diklasifikasikan sebagai sel yang mudah mengalami diferensiasi karena memiliki reseptor estrogen + (Wozniak and Keely, 2005). Sel ini sensitif terhadap *doxorubicin* (Zampieri *et al.*, 2002) dan mengalami *missense mutation* pada residu 194 (dalam *zinc binding domain* L2) gen p53. Loop L2 ini berperan penting pada pengikatan DNA dan stabilisasi protein. Jika p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA, kemampuannya untuk regulasi *cell cycle* dapat berkurang atau hilang (Schafer *et al.*, 2000). Pada sel tumor dengan mutasi p53, diketahui terjadi pengurangan respons terhadap agen-agen yang menginduksi apoptosis dan tumor-tumor tersebut kemungkinan

menjadi resisten terhadap obat antineoplastik yang memiliki target pengrusakan DNA (Crawford, 2002).



**Gambar 2.8.1** Morfologi Sel T47D Akibat Perlakuan EP 60 µg/mL (a) dibandingkan dengan sel tanpa perlakuan/kontrol sel (b). Dilakukan dengan menginkubasi  $3 \times 10^3$  sel T47D dengan EP (30-210 µg/mL) selama 48 jam



**Gambar 2.8.2** Morfologi Sel MCF-7 Pada Perlakuan EP dan FKP. Uji dilakukan dengan menginkubasi  $5 \times 10^3$  sel MCF-7 dengan EP (25-100 µg/mL) dan FKP (10-500 µg/mL) selama 48 jam. A adalah kontrol sel, B adalah sel dengan perlakuan EP 75 µg/mL, C adalah sel dengan perlakuan FKP 70 µg/mL

## 2.9 Tinjauan tentang Ekstraksi

Mengingat meningkatnya permintaan obat herbal, kualitas dan keamanan dari bahan obat menjadi sangat penting. Ekstrak herbal standar dianggap lebih ilmiah daripada obat-obatan sintetik. Teknik yang umum digunakan untuk menghilangkan zat aktif dari obat kasar disebut ekstraksi. Pemilihan pelarut sangat penting dalam pembuatan ekstrak, karena penyusun aktif tanaman memiliki afinitas untuk pelarut (Amriptal, 2010).

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen aktif dari suatu campuran padatan dan/atau cairan dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ini merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian tanaman obat, karena preparasi ekstrak kasar tanaman merupakan titik awal untuk isolasi dan pemurnian

komponen kimia yang terdapat dalam tanaman (Mandal *et al.*, 2007). Bombardelli (1991) menyatakan bahwa ekstraksi senyawa aktif dari tanaman obat adalah pemisahan secara fisik atau kimiawi dengan menggunakan cairan atau padatan dari bahan padat. Ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa cara sebagai berikut (Depkes, 2000) :

#### A. Maserasi

Maserasi adalah proses pengesktrakan simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan cara melakukan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature atau suhu kamar. Untuk konsep dari proses maserasi itu sendiri terbagi menjadi 2, yaitu Maserasi kinetik dan Remaserasi. Maserasi kinetik berarti pengadukan dilakukan secara terus menerus (kontinu), sedangkan Remaserasi dilakukan proses maserasi dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan filtrate pertama dan seterusnya.

#### B. Perkolasi

Perkolasi adalah salah satu cara ekstraksi yang menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan pada temperature ruangan. Proses perkolasi itu sendiri terdiri dari pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak) yang dilakukan secara terus menerus perkolat yang jumlahnya sebanyak 1-5 kali dari bahan awal.

#### C. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada suatu temperature titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga termasuk salah satu proses ekstraksi yang sempurna.

#### D. Sokletasi

Sokletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang mana pada umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi yang berkelanjutan dengan jumlah pelarut relatif yang konstan dengan adanya pendinginan balik.



Terdapat dua macam ekstraksi padat-cair, yaitu dengan cara sokhlet dan perkolasi dengan atau tanpa pemanasan (Sabel *and* Warren 1973 in Muchsony 1997). Menurut Brown (1950) dalam Muchsony (1997), metode lain yang lebih sederhana dalam mengekstrak padatan adalah dengan mencampurkan seluruh bahan dengan pelarut, lalu memisahkan larutan dengan padatan tak terlarut.

Menurut Harborne (1987), metode maserasi digunakan untuk mengekstrak jaringan tanaman yang belum diketahui kandungan senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari. Kekurangan dari metode ini adalah waktu yang relatif lama dan membutuhkan banyak pelarut. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan prinsip kelarutan. Prinsip kelarutan adalah *like dissolve like*, yaitu (1) pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, demikian juga sebaliknya pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar, (2) pelarut organik akan melarutkan senyawa organik. Ekstraksi senyawa aktif dari suatu jaringan tanaman dengan berbagai jenis pelarut pada tingkat kepolaran yang berbeda bertujuan untuk memperoleh hasil yang optimum, baik jumlah ekstrak maupun senyawa aktif yang terkandung dalam contoh uji.

## **2.10 Tinjauan tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas tergolong "kromatografi planar." KLT adalah yang metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai. Kromatografi planar juga dapat digunakan untuk pemisahan skala preparatif yaitu dengan menggunakan lempeng, peralatan, dan teknik khusus (Lestyo, 2011).

Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di

dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok (Lestyo, 2011).

Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Berbagai mekanisme pemisahan terlibat dalam penentuan kecepatan migrasi. Kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor (transfer karge), ikatan ionion, ikatan ion-dipol, dan ikatan van der Waals (Lestyo, 2011).

Pengambilan sampel, pengawetan, dan pemurnian sampel adalah masalah umum untuk KLT dan metode kromatografi lainnya. Sebagai contoh, pengembangan KLT biasanya tidak sepenuhnya melarutkan kembali analit yang berada dalam lempeng kecuali dilakukan pemurnian sebelumnya (*clean up*). Metode *clean up* paling sering dilakukan pada ekstraksi selektif dan kromatografi kolom. Dalam beberapa kasus zat/senyawa perlu dikonversi dahulu sebelum dianalisis dengan KLT. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan turunan senyawa yang lebih cocok untuk proses pemisahan, deteksi, dan / atau kuantifikasi. KLT dapat mengatasi sampel yang terkontaminasi, seluruh kromatogram dapat dievaluasi, mempersingkat proses perlakuan sampel sehingga hemat waktu dan biaya. Kehadiran pengotor atau partikel yang terjerap dalam sorben fase diam tidak menjadi masalah, karena lempeng hanya digunakan sekali (habis pakai) (Lestyo, 2011).

Deteksi senyawa menjadi mudah ketika senyawa secara alami dapat berwarna atau berberfluoresensi atau menyerap sinar UV. Namun, perlakuan penambahan pereaksi penampak noda dengan penyemprotan atau pencelupan

terkadang diperlukan untuk menghasilkan turunan senyawa yang berwarna atau berfluoresensi. Pada umumnya senyawa aromatik terkonjugasi dan beberapa senyawa tak jenuh dapat menyerap sinar UV. Senyawa-senyawa ini dapat dianalisis dengan KLT dengan fase diam yang diimpregnasi indikator fluoresensi dan deteksi dapat dilakukan hanya dengan pemeriksaan di bawah sinar UV 254 nm (Lestyo, 2011).

Pada KLT, identifikasi awal suatu senyawa didasarkan pada perbandingan nilai  $R_f$  dibandingkan  $R_f$  standar. Nilai  $R_f$  umumnya tidak sama dari laboratorium ke laboratorium bahkan pada waktu 4 analisis yang berbeda dalam laboratorium yang sama, sehingga perlu dipertimbangkan penggunaan  $R_f$  relatif yaitu nilai  $R_f$  noda senyawa dibandingkan noda senyawa lain dalam lempeng yang sama. Faktor-faktor yang menyebabkan nilai  $R_f$  bervariasi meliputi dimensi dan jenis ruang, sifat dan ukuran lempeng, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dan metode persiapan sampel KLT sebelumnya. Konfirmasi identifikasi dapat diperoleh dengan mengerok noda dalam lempeng kemudian analit dalam lempeng dielusi dan dideteksi dengan spektrometri inframerah (IR), spektrometri Nuclear Magnetic Resonance (NMR), spektrometri massa, atau metode spektrometri lain jika senyawa hasil elusi cukup tersedia. Metode identifikasi ini juga dapat menggunakan untuk menandai zona langsung pada lapisan (*in situ*) (Lestyo, 2011).

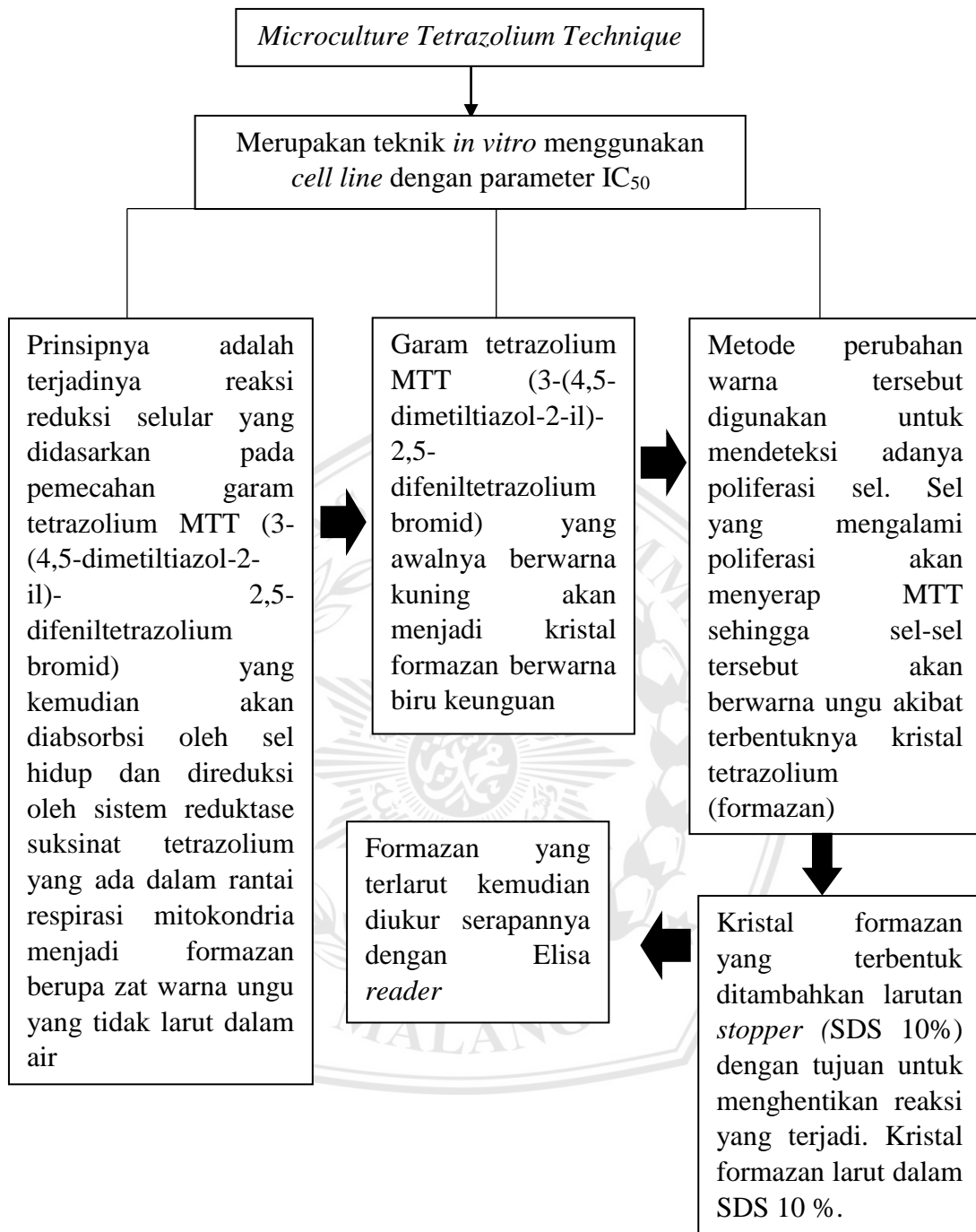
## 2.11 Tinjauan Tentang MTT-Assay

Dalam pengembangan obat antikanker baru sebagai agen-agen kemoterapi kanker, evaluasi preklinik merupakan salah satu hal yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas neoplastiknya. Evaluasi ini tidak hanya digunakan untuk obat-obat antikanker, tetapi juga untuk obat-obat lainnya, kosmetik, zat tambahan makanan, serta pestisida. Evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis disebut uji sitotoksitas. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji toksisitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduibel dengan variasi yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis-respon harus sejalan dengan efek yang muncul pada *in vivo*. Sebelum

dilakukan uji secara *in vivo*, didalam kasus kanker dapat dilakukan uji sitotoksitas *in vitro* terlebih dahulu. Uji sitotoksitas merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang sering digunakan untuk mendeteksi tingkat toksitas dari suatu senyawa. Sistem tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel (Anggraini, 2008).

Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT Assay. Metode MTT merupakan metode yang digunakan untuk pengujian sitotoksitas secara *in vitro*. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan sel hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (CRRC, 2009). MTT Assay didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu dan tidak larut. Reduksi garam tetrazolium terjadi intraseluler menyangkut enzim *succinic dehidrogenase* dari mitokondria. Namun Berridge membuktikan bahwa reduksi terutama melibatkan enzim retikulum endoplasma yang bergantung pada NADH, sedangkan enzim mitokondria hanya berperan dalam porsi kecil (Siregar, 2000).

Beberapa peneliti telah membandingkan metode MTT Assay untuk pengukuran jumlah sel dengan metode lain, dan menyatakan bahwa metode MTT mempunyai keunggulan disamping beberapa kelemahannya. Kelebihannya adalah dapat dibuat semiotomatis, valid, tidak memerlukan transfer sel, dan tidak menggunakan radioisotop. Kelemahannya antara lain nilai absorbansi absolut tidak sama pada berbagai galur sel sehingga sebaiknya dilakukan uji pendahuluan dan perbandingan dengan uji sitotoksitas lainnya. Namun terlepas dari beberapa kekurangan yang dimiliki, MTT assay merupakan metode yang simpel, valid dan cepat untuk menilai jumlah sel.



**Gambar 2.11** Mekanisme Kerja MTT-Assay